

IN VITRO PERFUSION EINER MENSCHLICHEN NIERE
MIT 7α -³H-DEHYDROEPIANDROSTERON

HARTMUT JOHANNES WÖLLNER

1978

Aus der Frauensilinde der
Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

In dieser Festschrift einer
menschlichen Arbeit wird
der 100. Geburtstag gefeiert

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Herausgegeben von
Johannes Gutenberg

Mainz 1977

Fachbereichsdekan: Professor Dr. Schweikert

1. Gutachter: Professor Dr. Knapstein

2. Gutachter: Professor Dr. Friedberg

Tag der mündlichen Prüfung: 18.1.1978



Gesamtherstellung



DITTERS BÜRODIENST

6501 HEIDESHEIM/RHEIN

AM KAPELLECHEN 1 · RUF 06132/57 11

A. Einleitung	S. 1
Einleitung des UFA's bei der Ein-	
schaltung von Phosphorsäure, Ammonium-	
und Nitrogensäure anhand einer Struktur-	
formelgleichung	S. 2

B. Literaturreferenzen	S. 3
------------------------	------

1. Trennungsgang von Ammoniumphosphat-	
und Ammoniumnitratgemischen	
mittels Ammonium	S. 3

2. Trennungsgang von Ammoniumphosphat	
mittels Ammonium	S. 4

M E I N E N E L T E R N

C. Ergebnisse und Diskussion	S. 5
------------------------------	------

1. Durchführung des Trennungsgangs	S. 5
------------------------------------	------

2. Trennungsgang des Ammoniumphosphats	S. 6
--	------

a. Trennung des UFA	S. 6
---------------------	------

b. Ammoniumphosphat	S. 7
---------------------	------

c. Ammoniumnitrat	S. 8
-------------------	------

d. Ammoniumphosphat	S. 9
---------------------	------

e. Ammoniumphosphat	S. 10
---------------------	-------

f. Ammoniumphosphat	S. 11
---------------------	-------

3. Ergebnisse und Diskussion	S. 12
------------------------------	-------

D. Zusammenfassung	S. 13
--------------------	-------

Zusammenfassung	S. 13
-----------------	-------

Literatur	S. 14
-----------	-------

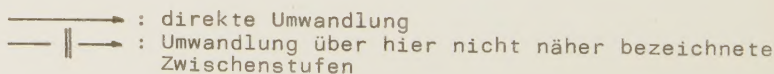
E. Literaturverzeichnis	S. 15
-------------------------	-------

INHALTSVERZEICHNIS

A. Einleitung	S. 1
Stellung des DHEA's bei der Biosynthese von Progesteron, Androgenen und Östrogenen anhand einer Strukturformelübersicht	S. 2
B. Literaturübersicht	S. 3
1. Metabolismus von Dehydroepiandrosteron und Dehydroepiandrosteronsulfat, allgemein	S. 3
2. Metabolismus von Steroiden in der Niere, besonders von DHEA	S. 7
C. Eigene Untersuchungen	S. 20
1. Durchführung des Experimentes	S. 20
2. Chemische Aufarbeitung des Materials	S. 21
a. Perfusat und Urin	S. 21
b. Nierengewebe	S. 21
c. Charakterisierung freier Steroide	S. 22
d. Derivatbildung	S. 23
e. Abkürzungen und Trivialnamen	S. 23
3. Ergebnisse und Diskussion	S. 24
D. Zusammenfassung	S. 29
Tabellen 1 - 6	S. 30
	- 35
E. Literaturverzeichnis	S. 36

A. Einleitung

Untersuchungen über den Metabolismus von Steroiden in der menschlichen Niere sind bis heute kaum durchgeführt worden. Zwei technische Methoden stehen neben der Inkubation für solche Untersuchungen zur Verfügung: Einmal die Möglichkeit einer in-vivo Perfusion, zum anderen die einer in-vitro Perfusion. Eine hinreichend erfolgreiche in-vivo Perfusion scheitert wegen der starken Nierendurchblutung beim Menschen an der Kürze der nur bis zu maximal 2 Minuten möglichen Perfusionsdauer. In der Literatur wird lediglich nur von einer über 10 Minuten dauernden Perfusion in-vivo beim Menschen durch Hoffmann et al. (1974) berichtet. Als Alternative bietet sich in diesem Zusammenhang eine Langzeitperfusion im standardisierten System in vitro an. In einem Perfusor der Marke GAMBRO ließ sich eine den in vivo entsprechenden Bedingungen Perfusion durchführen, um nähere Erkenntnisse über den Metabolismus des Dehydroepiandrosterons in der menschlichen Niere zu gewinnen.



B. Literaturübersicht

1. Metabolismus von Dehydroepiandrosteron und Dehydroepiandrosteronsulfat, allgemein

Das mengenmässig wichtigste Steroid im menschlichen Blut stellt das Dehydroepiandrosteron (3 β -Hydrox-androst-5-en-17-on, DHEA) dar. Im Plasma gesunder Männer und Frauen werden Konzentrationswerte dieses C₁₉-Steroids bei Produktionsraten von 10-40 μ g/die (Mac Donald et al. 1965) bis zu 250 μ g bzw. 150 μ g/100 ml erreicht (Baulieu, 1960). Die Wirkung der eigentlichen Steroidhormone der Nebennierenrinde und Gonaden werden als freie Verbindungen erreicht; im Gegensatz dazu liegt DHEA im menschlichen Blut fast ausschließlich als Sulfonkonjugat vor (Baulieu, 1960). Freies DHEA und DHEA-Glucuronid macht, gemessen an der Gesamtmenge des zirkulierenden DHEA's höchstens 1 % bzw. 0,5 % aus (Cohen et al. 1961 und Knapstein et al. 1967). Das von der Nebennierenrinde sezernierte, sulfonkonjugierte DHEA (Baulieu 1962 und Oertel 1964) besitzt lipophilen Charakter und gleicht in Zusammensetzung wie physikochemischen Eigenschaften weitgehend einem Steroid-ester der Sulfatidsäure oder Diglyceridschwefelsäure (Oertel 1966; Oertel 1961; Oertel et al. 1962). Eine Isolierung wird durch die Unbeständigkeit des endogenen lipophilen Sulfonkonjugates oder Sulfatids, das im Blut allem Anschein nach an ein Protein der Albuminfraktion: Postalbumin (Oertel et al. 1965) gebunden ist, erschwert. Jedoch sprechen auch physiologische-biochemische Befunde für das Vorkommen von Steroidsulfatiden; DHEA-Sulfat passiert zum Beispiel die menschliche Leber ohne Hydrolyse, im Gegensatz zu dem daraus entstehenden lipophilen Sulfonkonjugat (Oertel et al. 1966). DHEA-Sulfat wird weiterhin aus dem Darm wahrscheinlich erst durch Überführung in Sulfatid resorbiert (Knapstein et al. 1967).

DHEA-Sulfat wird nach oraler oder parenteraler Applikation sehr bald in DHEA-Sulfatid umgewandelt (Oertel 1963). Der Metabolismus entspricht in qualitativer Hinsicht demjenigen des freien Steroids oder des DHEA-Glucuronosids (Oertel et al. 1966; Dorfmann et al. 1965; Knapstein et al. 1967). Zur Zeit kann noch nicht gesagt werden wie die quantitativen Zusammenhänge zwischen Substrat und Metaboliten von einem zu postulierendem Gleichgewicht Steroid-sulfatid-Steroid-Sulfat-freies Steroid-Steroidglucuronosid abhängen. Zu den bedeutensten Metaboliten, die sowohl im Harn (Baulieu et al. 1965) als auch durch die Haut im Schweiß (Oertel et al. 1968) ausgeschieden werden, gehören neben anderen Ring-A-gesättigten C_{19} -Steroiden die 17-Ketosteroide Androsteron (3 α -Hydroxy-5 α -androstan-17-on) und Ätiocholanolon (3 α -Hydroxy-5 β -androstan-17-on). Das sulfonkonjugierte DHEA und das DHEA-glucuronosid wird ohne vorherige Spaltung des Konjugats metabolisiert (Oertel et al. 1966). Im Verlauf der zugrundliegenden Reaktionen wird zunächst eine Dehydrierung in Ring A zur Oxydationsstufe des Androstendions (Androst-4-en-3, 17-dion) angenommen, dessen Sulfonkonjugat (Schubert et al. 1967) die Struktur eines 3,5-Dienolesters besitzt (Oertel et al. 1966). Androstendion und Testosteron (17 β -Hydroxy-androst-4-en-3on) aber, die wie ihre Vorstufen DHEA und Androstendiol (Androst-5-en-3 β , 17 β -diol) einem durch 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase gesteuerten Redoxgleichgewicht unterliegen sind ebenso als Präkursoren für die Biosynthese von Östrogenen bekannt (Wotiz et al. 1936; Smith et al 1962; Breuer 1962). Während also auf der einen Seite das beschriebene Sulfonkonjugat des Androstendions einer fortschreitenden Reduktion zu gesättigten C_{19} -Steroiden unterworfen ist, führen Hydroxylierung der 4⁵-3 β -Hydroxy- und 4⁴-3-Ketosteroide an C_{19} , Dehydrierung und Aromatisierung auf der anderen schließlich zu sulfonkonjugierten Östrogenen (Oertel et al. 1967). Die Bildung von Androgenen und Östrogenen aus

sulfonkonjugiertem DHEA (DHEA-Sulfat bzw. DHEA-Sulfatid) ist experimentell gesichert (Oertel et al. 1966; Bolte et al. 1964; Morato et al. 1965; Oertel et al. 1965; Siiteri et al. 1966; Loriaux et al. 1968). Allerdings können durch die im Gewebe verbreitete Sulfataseaktivität auch freie Androgene und Östrogene auftreten. Trotzdem aber wird dem direkten Metabolismus des DHEA-Sulfatids die viel größere Bedeutung zugeschrieben. Die bis vor nicht langer Zeit bestehende Ansicht, daß die Konjugation von Steroiden nur der Elimination überschüssiger Steroidhormone oder deren Metaboliten dienen, hat sich grundlegend geändert. Es hat sich gezeigt, daß außer der indirekten physiologischen Wirksamkeit des sulfonkonjugierten DHEA's, die auf seinem Metabolismus zu freien und sulfonkonjugierten Androgenen und Östrogenen beruht, die Sulfonkonjugate bestimmter Steroide auch einen direkten Einfluß auf gewisse Enzymsysteme haben. So wird zum Beispiel die Phosphorylase durch sulfonkonjugierte Enzyme gehemmt (Mason et al. 1958; Mason et al. 1960).

Bei Versuchen mit DHEA konnte zunächst zwar nur eine Hemmung der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase durch freies Steroid beobachtet werden; klinische Ergebnisse widersprechen den entsprechenden negativen Resultaten mit DHEA-Sulfat. Man hat nämlich eine Erniedrigung der DHEA-Exkretion bei manchen patho-physiologischen Zuständen wie beschleunigte Liposynthese, Tendenz zur Thrombose, vorzeitige Arteriosklerose und Adipositas beobachtet (Sonka et al. 1963; Sonka et al. 1965), die mit einer erhöhten Stoffwechselaktivität im Pentosephosphatzyklus als Folge einer gesteigerten Aktivität der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase einhergeht. Das im Harn vorliegende DHEA liegt fast nur als Sulfat vor, das seinerseits dem DHEA-Sulfatid im Kreislauf entstammt, so daß ein Mangel an DHEA eher ein Fehlen sulfonkonjugiertem DHEA's bedeuten sollte.

Jüngste Experimente haben indessen diese scheinbaren Widersprüche aufgeklärt. Man konnte nämlich nachweisen, daß durch physiologische Mengen DHEA-Sulfat, ob sie nun synthetisch, biosynthetisch oder aus menschlichem Plasma gewonnen wurden, eine starke Hemmung der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase menschlicher Erythrozyten (Oertel et al. 1966), menschlichen Leber-, Gehirn-, Ovar-, Testis-, und Placentagewebes eintrat (Oertel et al. 1970a; Oertel et al. 1970b; Oertel et al. 1970c; Menzel et al. 1970a; Menzel et al. 1970b).

Es wurden Versuche unternommen, das im menschlichen Organismus gelegentlich fehlende DHEA-Sulfatid durch externe Zufuhr von DHEA-Sulfat zu ergänzen; es wurde fast vollständig aus dem Darm resorbiert (Fries et al. 1967). Die Gabe von 10-20 mg DHEA-Sulfat/Tag über 2-8 Wochen führte bei gesunden Männern und Frauen vor der Menopause zu einem Anstieg von DHEA und seinen Metaboliten im Blut und im Harn (Oertel et al. 1970d). Die absolute Konzentration von Androgenen und Östrogenen im Harn nahm dabei zu (Oertel et al. 1970e), das Verhältnis von Androgenen zu Östrogenen änderte sich jedoch nicht wesentlich. So konnte man nachweisen, daß eine negative Beeinflussung - im Sinne einer Feminisierung bzw. Virilisierung - durch Gabe von DHEA-Sulfat, auch bei höherer Dosierung über längere Zeit nicht eintrat.

Von klinischer Bedeutung wäre die Tatsache, daß in der Menopause, in der das Verhältnis Androgene zu Östrogene gegenüber der Norm verschoben ist, eine Normalisierung des Quotienten durch Gabe von ca. 10-20 mg DHEA-Sulfat erreicht werden konnte und somit eine Beeinflussung des Menopausensyndroms möglich ist (Rindt et al. 1969; Kaiser et al. 1969). Man nimmt an, daß der Östrogenmangel in der Menopause vorwiegend durch unzulängliche Bereitstellung des sulfonkonjugierten DHEA's als bevorzugter Präkursor hervorgerufen wird und sich somit durch Gabe von DHEA-Sulfat wenigstens teilweise beheben läßt (Kaiser et al. 1969).

Für eine andere klinische Erscheinung in der Dermatologie, nämlich die Akne, werden Störungen im Hormonhaushalt verantwortlich gemacht (Vadasz et al. 1967); und hier besonders wieder die Verschiebung des Quotienten Androgene zu Östrogenen (Treiber et al. 1968). Man konnte auch in Hauteluaten von Aknekranken eine Verschiebung dieses Quotienten nachweisen und durch Gabe von DHEA-Sulfat eine Besserung des Krankheitsbildes in den meisten Fällen erreichen (Brehm et al. 1969).

Auch konnten günstige Therapieerfolge bei Stoffwechselanomalien des DHEA-Mangelsyndroms (Sonka et al. 1965) durch Gabe von DHEA-Sulfat erreicht werden. Bei Adipositas zum Beispiel sanken die hohen Glucose-6-Phosphatasewerte in Erythrozyten unter der Behandlung mit DHEA merklich ab.

Als Schlußfolgerungen wurden aus diesen Untersuchungen folgende Ergebnisse gezogen: Das endogene lipophile DHEA-Sulfatid erfüllt eine doppelte Aufgabe. Zum ersten fungiert es als potentielle Vorstufe der im Organismus benötigten Androgene und Östrogene, zum zweiten reguliert es die Glucose-6-Phosphatase-dehydrogenase (Oertel 1971a).

2. Metabolismus von Steroiden in der Niere, besonders von DHEA

Untersuchungen über den Stoffwechsel der Androgene ergaben die in der folgenden Tabelle aufgeführten Ergebnisse:

17-Ketosteroide im Urin (mg/l)

	Androsteron	5 β Androsteron	DHEA
Mann	1,6	1,4	0,2
Frau	1,3	1,3	0,2
Eunuch	0,5	0,9	2,0
Kastr. Frau	1,1	1,2	0,1
Frau mit			
Nebennieren-Tu	0,3	13	88

Durch Metabolisierung und Konjugierung werden Hormone in weniger wirksame Hormone oder inaktive Steroide umgewandelt und als Konjugate im Urin oder in der Galle ausgeschieden. Ursprünglich sah man die Steroide im Urin als die eigentlichen Hormone an. Man vergaß dabei oft, daß man bei biologischen Testen und chemischen Analysen von Urinextrakten immer erst die Konjugate aufspalten muß. In den dreißiger Jahren wurden die im wesentlichen noch heute geltenden Konzepte entwickelt.

Klassisch ist das Beispiel des Pregnandiols; 1929 wurde es aus dem Harn isoliert, noch ehe man Progesteron gefunden hatte (Marrian 1929). 1933 wurde die Struktur des Pregnandiols aufgeklärt. Als man dann zwei Jahre später das Progesteron entdeckte, konnte man die Unterschiede beider Substanzen bestimmen. Chemisch gesehen war das Pregnandiol als Reduktionsprodukt des Progesterons aufzufassen. Pregnandiol war zunächst nach Hydrolyse des Harns gewonnen worden. 1936 gelang Venning die Isolierung des quantitativ wichtigsten Konjugates, nämlich des Pregnandiolglucosiduronates (Venning et al. 1936). Daß es ein Abbauprodukt des Progesterons ist, war schon zuvor postuliert worden. Der Anstieg im Urin nach hohen Gaben von Progesteron machte dies nun nach Untersuchungen vom gleichen Autor sehr wahrscheinlich (Venning et al. 1937). Der Beweis wurde schließlich mit radioaktivem Progesteron erbracht.

Nach Gabe von C^{14} -Progesteron wurde C^{14} -Pregnandiol aus Urin isoliert.

Der Abbau des Progesterons zu Pregnandiol erfolgt über 5 β -Pregnan-3,2 α -dion, 3- Δ -Hydroxy-5 β -pregnan-2 α -on zu 3 Δ , 2 α -Dihydroxy-5- β -pregnan (Pregnandiol). Ebenfalls möglich erscheint der Abbau über 2 α -Hydroxypregn-4-en-3-on direkt zu Pregnandiol; der Beweis für diesen Weg steht jedoch noch aus. Als Ausscheidungsprodukt wurde auch das Zwischenprodukt 3 Δ -Hydroxy-5 β -pregnan-2 α -on identifiziert (nach Zander). Jedoch werden nach Injektion von Pregnandiol um 16-20 % davon im Harn ausgeschieden. Das führt zu der Annahme, daß es weit weniger ein Endprodukt ist als etwa Östradiol; zudem sind Pregnandiol und Pregnanolon nicht die einzigen Metaboliten des Progesterons. Dadurch, daß die Reduktionen zu verschiedenen Zeiten an verschiedenen Stellen des Moleküls erfolgen können, sind viele Metaboliten möglich. Aus der Reihe der tatsächlich aufgefundenen sind die Allopregnane zu erwähnen, die Wasserstoff am C-Atom in 5 Δ -Stellung tragen, wie Allopregnandiol und Allopregnanolon. Sie alle treten normalerweise quantitativ gegenüber dem Pregnandiol zurück. Konjugierung mit Glucuronsäure ist die Regel, aber auch Sulfate kommen vor. Untersuchungen mit an C_{21} markiertem Progesteron zeigen, daß ein Teil des Progesterons auch in der Seitenkette am C_{17} abgebaut wird. Plotz und Mitarbeiter waren imstande, nach Injektion von 21- C^{14} -Progesteron CO_2^{14} in der Ausatemluft festzustellen (Plotz 1961). Außerdem fanden sich in geringen Mengen C_{19} -Steroide im Urin.

Zander und Mitarbeiter fanden heraus, daß auch der Fetus aktiv am Abbau des Progesterons beteiligt ist (Zander 1961). Es wird unter anderem in das weniger wirksame 2 α -Hydroxypregn-4-en-3-on umgewandelt. In der Placenta kann es dann wieder zu Progesteron zurückoxydiert werden. Zander sah diese Tatsache als ökonomischen Schutzmechanismus des Fetus an (Zander 1963). Im Fetus selbst wird ein

Teil des Progesterons weiter abgebaut. Es wurde auch Pregnan diol gefunden. Sulfate herrschen als Konjugate vor. Von anderen C_{21} Steroiden sei noch erwähnt, daß 17 α -Hydroxyprogesteron durch vollständige Reduktion in Pregnan triol umgewandelt wird. Auch Cortison und Cortisol werden zu mehr oder weniger hydrierten Metaboliten wie den Tetrahydro-Verbindungen und den Cortolen abgebaut. Der Abbau des Testosterons erfolgt in Ring A ähnlich wie der des Progesterons. Der Metabolismus geschieht aber nicht ausschließlich in der Wirkung von Reduktasen, sondern im Gegenteil: In den quantitativ wichtigsten Metaboliten des Testosterons ist die 17 β -Hydroxyl-Gruppe zur Oxogruppe oxydiert. Oxydation bestimmter Hydroxylgruppen und dadurch Verminderung der biologischen Wirkung ist ein allgemeines Prinzip, von dem nur Progesteron eine Ausnahme zu sein scheint. Schubert und Wehrberger (Schubert et al. 1960) stellten fest, daß sich Testosteron auch darin von Progesteron unterscheidet, daß es selbst mit Glucuronsäure konjugiert und ausgeschieden werden kann. Völlige Klarheit besteht noch nicht darüber, wie der Abbau zu Androsteron und Ätiocholanolon im einzelnen erfolgt. Kirschner (Kirschner et al. 1964) konnte Hinweise geben, daß Androstendion nicht das obligate Zwischenprodukt ist. Die beiden Metaboliten Androsteron und Ätiocholanolon können aus allen Androgenen wie DHEA-Sulfat, Dehydroepiandrosteron, Androstendion und Testosteron entstehen. Im Vordergrund stehen dabei Dehydroepiandrosteron und dessen Sulfat. Dieses Dehydroepiandrosteronsulfat kommt im Venenblut der Nebenniere, im peripheren Blut und im Urin in derselben Struktur vor. Im Falle des Dehydroepiandrosterons hat es sich als zutreffend erwiesen, daß ein Hormon im Urin dem Hormon in der Drüse entspricht.

Der Metabolismus der Östrogene entspricht in der Oxydation der Hydroxylgruppe an C_{17} dem Testosteron. Unterschiede

bestehen darin, daß die Struktur im Ring A, soweit wir wissen, nicht weiter abgebaut wird. Dagegen kann das Östrogenmolekül in Position 2,6,11,15,16 und 18 oxygeniert werden (Breuer 1962; Diczfalusy et al. 1961). Weiter können Methyläther der 2-Hydroxyverbindungen gebildet werden. Die Sauerstofffunktionen in den Positionen 16 und 17 können, in den verschiedensten Kombinationen auftreten. Als Konjugate sind Glucosiduronate und Sulfate gefunden worden. Andere Konjugate sind nicht ausgeschlossen. Abbau zu nichtsteroidalen Verbindungen sind möglich, aber noch nicht im einzelnen aufgeklärt. Zu der Exkretion von Hormonen ist zu sagen, daß die Niere das wichtigste Ausscheidungsorgan dafür ist. Die im Urin ausgeschiedenen Hormone liegen nur zu einem sehr geringen Anteil in freier Form vor. Man vermutet, daß es sich um Steroide handelt, die erst bei der Passage durch den Urogenitaltrakt aus Konjugaten freigesetzt wurden. Plotz, J. konnte durch Injektion von markiertem Progesteron bei nichtschwangeren Frauen feststellen, daß etwa 15-45 % der injizierten Aktivität im Urin erschienen (Plotz 1961). Durch weitere Analysen fanden Klopper und Michie (Klopper et al. 1956) heraus, daß durchschnittlich 13 % des Progesterons als Pregnandiol an Glucuronsäure gebunden im Urin ausgeschieden wurden. Dazu ist zu bemerken, daß Progesteron nicht die einzige Muttersubstanz des Pregnandiols ist. Untersuchungen von Arcos, Gurpide, Vande Wiele und Liebermann (Dorfman 1956) gaben Hinweise, daß neben Desoxycorticosteron, das schon länger als Vorstufe des Pregnandiols bekannt war, zusätzlich Pregnenolon, Pregnenolonsulfat und 20 α -Hydroxypregnenolon als Muttersubstanzen existierten. Jedoch wird auch Progesteron in Form anderer Metaboliten wie Allopregnan diol, Pregnanolon und Allopregnaolon ausgeschieden. Normalerweise erscheine etwa 40-50 % des injizierten und wahrscheinlich auch endogen entstandenen Testosterons im Urin. Der größte Teil besteht aus Konjugaten des Androsterons und Ätiocholanolons (Dorfman et al. 1956). Nur etwa 1 % des Testosterons wird als Glucosiduronat aus-

geschieden. Androsteron und Ätiocholanolon stammen zum größten Teil vom Dehydroepiandrosteron und dessen Sulfat. Ungefähr 70-80 % der vom Körper ausgeschiedenen Östrogene erscheinen normalerweise im Urin. Zugeführtes Östron und Östradiol werden zu etwa 20 % in Form von Östron- und Östradiol - sowie Östriolkonjugaten ausgeschieden. Gibt man Östriol, findet man dagegen 80 % wieder. Nach Injektion von Östradiol sind etwa zwei Drittel der Urinmetaboliten nicht identifiziert. Zu den bekannten Konjugaten zählen die 16- und 17-Glucosiduronate und das 3-Sulfat des Östriols, die man aus Schwangerenurinen isolieren konnte. Ladany und Finkelstein konnten im Urin von nichtschwangeren Frauen Östradiol, Östron und Östriol nachweisen. Die Beziehungen zwischen Hormonen und Urinmetaboliten stellten Zander und Henning in graphischer Form dar. Zusätzlich finden sich hier auch die Beziehungen zwischen Corticosteroiden und deren Metaboliten im Harn. Huhtaniemi, I. (Huhtaniemi et al. 1972) untersuchten die Rolle der fetalen Niere im Hinblick auf die Metabolisierung der freien Steroide. Sie verwendeten Nieren von 10-14 Wochen alten menschlichen Feten. Die Suche nach freien Steroiden blieb ergebnislos, an Monosulfaten entdeckten sie Dehydroepiandrosteron, 16 α -OH-DHEA, Pregnenolon, 5-Androsten-3 β , 17 α -diol, 16 β -OH-DHEA, 3 β , 17 β -OH-5-androsten-16-on, 5-Pregnen-3 β , 20 α -diol, 16 α -OH-Pregnenolon und 17 α -OH-Pregnenolon. Mengenmäßig traten die drei Erstgenannten in den Vordergrund. An Disulfaten konnten identifiziert werden, vornehmlich 5-Androsten-3 β , 17 α -diol, aber auch 5-Androsten-3 β , 17 β -diol, und 5-Pregnen-3 β , 20 α -diol. Nach der Inkubation von DHEA, Pregnenolon und ihrer Sulfonkonjugate mit Schnitten oder Homogenaten von Nierengewebe konnten die 16 α -Hydroxylase, 17 β Reduktase und Sulfokinase als Enzyme nachgewiesen werden. Das war der Beweis dafür, daß die fetale Niere in der frühen und mittleren Schwangerschaft am Metabolismus der neutralen Steroide beteiligt ist.

Mit Hilfe von in-vivo Versuchen konnten Cohn und Hume (Cohn et al. 1960) über Konjugationsreaktionen von Steroiden- in diesem Falle mit einer Hundeniere- berichten, daß die Niere imstande ist, Androsteron und Ätiocholanolon zu konjugieren. Auch Moser (Moser et al. 1966) konnte die Fähigkeit der Niere zur Steroidkonjugation nachweisen, indem sie zeigten, daß radioaktiv-markiertes ^{35}S -Sulfat in-vivo von der menschlichen Niere in Cholesterol- ^{35}S -Sulfat überführt wurde. Im Jahre 1968 konnten Rice (Rice et al. 1968) die gleichen Reaktionen in der Rattenniere und Rattenleber nachweisen: ^{35}S -markiertes Sulfat wurde unter in-vitro Bedingungen mit Nieren- und Leberhomogenaten inkubiert. Die Radioaktivität wurde anschließend als Cholesterol- ^{35}S -Sulfat wiedergefunden. Als zusätzlich nicht-markiertes Cholesterol mit inkubiert wurde, konnte mehr ^{35}S -Sulfat in der Lipidfraktion festgestellt werden. Nach Hinzufügen von ^3H -markiertem Cholesterol zu den Homogenaten entstand ^3H -Cholesterol-Sulfat. Nach parenteraler Gabe von ^{35}S -Sulfat und Cholesterol- ^{35}S -Sulfat tauchte die Aktivität ebenfalls überwiegend in den Lipidfraktionen von Leber und Niere auf. Auf diese Art und Weise konnte die Existenz von Cholesterol-sulfo-transferase in Leber und Niere der Ratte durch Konjugation von exogenem und endogenem Cholesterol zu entsprechendem Sulfat nachgewiesen werden.

Im Jahre 1969 konnten Dillard (Dillard et al. 1969) anhand von Versuchen die Fähigkeit der Niere, C_{19} -Steroide zu konjugieren, nachweisen. In einem in-vitro Versuch wurde in einem Ringer-Bicarbonat-Puffer-System radioaktiv-markiertes Androsteron mit Nierenschnitten von Meerschweinchen inkubiert. Der Versuch wurde einmal in einem O_2 - CO_2 -Gemisch als auch unter anaeroben Bedingungen mit N_2 und CO_2 durchgeführt. Mit Hilfe eines Chloroform/Wassersystems wurden die polaren und nicht-polaren Metaboliten aufgetrennt. Unter den nicht-polaren Metaboliten fanden sich

Androsteron und andere nicht identifizierte Steroide. Unter den polaren Metaboliten wurde eine Anzahl von Konjugaten identifiziert; zu gleichen Mengen konnten in dieser Fraktion Androsteron-Glucuronid und Androsteron-Sulfat nachgewiesen werden. Bei den anaeroben Inkubaten konnten demgegenüber keine Glucuronide isoliert werden, während die Veresterung mit Sulfat auch hier möglich war.

Am Beispiel von Östronsulfat konnten Zuckermann et al. (Zuckermann et al. 1969) ebenfalls im Jahre 1969 zeigen, daß unter in-vivo-Bedingungen die Möglichkeit der Hydrolyse- also des umgekehrten Vorganges der Konjugation- in der Rattenniere besteht. Es wurden die Fähigkeiten vieler Rattenorgane zur Hydrolyse dieses Hormonkonjugates verglichen, nachdem vorher radioaktiv-markiertes Östronsulfat sowie andere Steroidsulfate unter in-vivo Bedingungen injiziert worden waren. Das Ergebnis war, daß die Aktivität des Hydrolyseenzym für das Östronsulfat in der Niere maximale Werte zeigte. Und zwar wurden als Ort der größten Radioaktivität die Mikrosomen festgestellt; dort fand offenbar die oben beschriebene Reaktion statt. Der Sinn der hohen Hydrolyserate der Niere war möglicherweise darin zu sehen, daß diese Reaktion durch Übergang des Östrogen-Sulfates in das entsprechende Glucuronid eine bessere Ausscheidung ermöglicht. Die Rolle der Niere bei der Konjugation phenolischer Steroide untersuchten Kirdani et al. (Kirdani et al. 1972). Sie untersuchten die Rolle der Niere bei Glucurosidierung von Östriol anhand von drei Systemen: Im ersten arbeiteten sie in-vivo mit menschlichen Nieren, wobei jeweils Einzelinjektionen oder 40-minütige Dauerinfusionen vorgenommen wurden. Dabei wurde das markierte Steroid entweder in die Arteria renalis oder in eine periphere Vene appliziert. Die Bestätigung des Ergebnisses wurde durch in-vitro Versuche mit homogenisiertem menschlichen Nierengewebe sowie Perfusionen von Paviannieren erbracht. Bei den in-vivo Versuchen konnte nachgewiesen werden, daß die

menschliche Niere in der Lage ist, daß Östriol in Position 16 zu glucuronidieren. Auch beim Homogenat, das mit Östriol und Uridindiphosphoglucuronsäure (UDPGA) inkubiert wurde, konnte eine Glucuronidierung des Steroids gezeigt werden. Auch bei der Pavianniere konnte diese Reaktion nachgewiesen werden. So konnte mit Hilfe der daraus resultierenden Ergebnisse der Metabolismus des Hormons weiter erhellt werden. Nach der Injektion von Östriol ins Blut erfolgt die Verarbeitung zunächst in der Leber im Sinne einer 16-Glucuronidierung. Ein Teil wird zusätzlich in Position 3 mit Sulfat verestert in die Galle ausgeschieden. Der größte Teil des 16-Glucuronids gelangt über das Blut in die Niere und von dort in den Urin. Von der Leber nicht metabolisiertes Östriol wird in der Niere 16-glucuronidiert und ausgeschieden. Das Östriol-3-sulfo-16-glucuronid gelangt zusammen mit einem Teil des 16-Glucuronides in den Dünndarm, wo völlige Hydrolyse und eine anschließende 3- oder 16-Glucuronidierung erfolgt. Über die Vena portae gelangen diese Konjugate zusammen mit freiem Östriol zurück in die Leber. Ein gewisser Teil wird im Urin ausgeschieden, während ein anderer wieder in Position 16 verestert und erneut in den enterohepatischen Kreislauf eingeschleust wird. Da Aldosteron so gut wie gar nicht von der Pavian-Niere glucuronidiert werden konnte, war der Beweis für die Spezifität der 16 Glucuronidierung des Östriols erbracht. Ebenso wenig war das Homogenat der menschlichen Niere fähig, Östron im gleichen Sinne wie Östriol zu verarbeiten. Darüberhinaus konnte bei der menschlichen Nierenperfusion das Östron nicht ausgeschieden werden. Also muß die Metabolisierung in einem anderen Organ erfolgen. Diese Tatsache wurde durch den Umstand untermauert, daß (anders wie bei Östriol) die Ausscheidung bei Injektion in die Nierenarterie langsamer erfolgt als bei Applikation in eine periphere Vene.

Nachdem Hobkirk (Hobkirk et al. 1971) im Jahre 1971 das 17 β -Östradiol-3-Glucuronid und das 17 β -Östradiol-17-Glucuronid als Metaboliten des 17 β -Östradiols im menschlichen Organismus nachweisen konnte, untersuchten sie 1974 (Hobkirk et al. 1974) anhand eines in-vitro Versuches mit menschlichen Nieren den Übergang von 17 β -Östradiol-6, 7-³H in das entsprechende 17 Glucuronid.

Bei dem Versuch wurden in Anwesenheit von UDPGA 17 β -Östradiol -6,7-³H, 17 β -Östradiol-6, 7-³H-Sulfat und Östriol-6, 7-³H mit Homogenaten menschlicher Nieren inkubiert. Das 17 β -Östradiol-6, 7-³H wurde hauptsächlich in 17 β -Östradiol-17-Glucuronid umgewandelt, was auf die Begünstigung der Position C₁₇ vor dem Kohlenstoffatom 3 bei der Glucuronidierung zurückgeführt wurde. Wegen der niedrigen Umwandlungsraten im Vergleich zu den Versuchen aus dem Jahre 1971 konnte man annehmen, daß der größte Teil der Synthese in extrarenalen Geweben erfolgen mußte. Nach Versuchen von Hoffmann (Hoffmann et al. 1968) mußte als möglicher Bildungsort die Magenmukosa in Betracht gezogen werden, da dort eine 17-Glucuronyl-Transferaseaktivität nachgewiesen wurde. Vergleichende Versuche mit den drei oben genannten Metaboliten ergaben nach Inkubation mit 17 β -Östradiol-6, 7-³H-Sulfat eine wesentlich geringere Ausbeute. Diese Erkenntnis ließ darauf schließen, daß die Glucuronidierung dieses Stoffes über 17 β -Östradiol-6, 7-³H verläuft. Bei einem Experiment, bei dem man Rinde und Mark getrennt mit 17 β -Östradiol-6, 7-³H inkubiert stellt sich heraus, daß in der Rinde ca. 20 mal mehr Glucuronidkonjugate synthetisiert wurden. Hobkirk (Hobkirk et al 1974) konnte 1974 anhand des im folgenden beschriebenen Versuches nachweisen, daß in der Niere der direkte Übergang von 17 β -Östradiol-3-Sulfat in Östron-3-Sulfat möglich ist: Es wurde radioaktiv-markiertes 17 β -Östradiol-3-Glucuronid und 17 β -Östradiol-3-Sulfat mit Homogenat menschlicher Niere inkubiert. Eine direkte Metabolisierung der Stoffe

zu Östron-3-Glucuronid bzw. Östron-3-Sulfat konnte nachgewiesen werden. Zudem fand eine direkte Metabolisierung von 17β -Östradiol in Östron statt. Ob nur ein einziges Enzym an diesen Reaktionen beteiligt war, konnte nicht festgestellt werden; nach Zugabe von NAD nahmen die Reaktionen stärker zu als bei NADP. Die Reaktionen in umgekehrter Reihenfolge fanden kaum statt, selbst nach Zugabe von NADH und NADPH. Ebenso veränderten sich die Hydrolyseraten bei Konjugaten und freiem 17β -Östriol im Verlaufe des Versuches. Nach getrennter Inkubation von Mark und Rinde konnte eine sehr hohe Dehydrogenase-Aktivität nach Zugabe von exogenem NAD nachgewiesen werden. Es imponierte in den Homogenaten eine hohe Sulfatase-Aktivität, im Gegensatz zur β -Glucuronidase. Keinerlei Hydrolysen brachten die gleichen Homogenate bei Inkubation mit Dehydroepiandrosteron-3-Sulfat. Weitere in der Niere vorkommende Enzyme, die maßgeblich am Metabolismus der Steroide in der Niere beteiligt sind konnte Hellmann (Hellmann et al. 1971) nachweisen: Sie untersuchten Blut und Urinproben auf Cortisol, Cortison und radioaktiv-markiertes H_2O nach i.v. Injektion von $14-^{14}C$ -Cortisol- $11-^3H$. Wahrscheinlich mehr als 50 % des injizierten Hormons zeigten eine Oxydation am C-Atom 11; die hohe Aktivität trat entsprechend als $^3H-H_2O$ zutage. Von dieser Umwandlungsrate wurden 10 % in der Niere durch die 11α -OH-Steroid-Dehydrogenase oxydiert. Aufgrund der auch ohne 3H -Markierung aufgetretenen Cortisol-Moleküle - sie konnten nur mit ^{14}C nachgewiesen werden - muß die Rückreaktion der Oxydation, nämlich die Reduktion in C_{11} erfolgt sein. Wegen der Differenz zwischen ^{14}C -Cortisol und 3H -Cortisol von 1:3 schloß man, daß die 11β -OH-Steroid-Dehydrogenase entscheidend an der biologischen Aktivität des Cortisols beteiligt ist.

Wie eingangs erwähnt liegt das DHEA im menschlichen Organismus fast völlig als Sulfonkonjugat vor. Bei Gesunden konnten im Harn nur wasserlösliche Sulfate, Glucuronide und freie Steroide festgestellt werden, jedoch keine Steroidsulfatide. Daraus muß geschlossen werden, daß im Verlauf der Nierenpassage eine Hydrolyse der lipophilen Steroid-Sulfatide zu Steroidsulfaten stattfand. Hoffmann und Mitarbeiter (Hoffmann et al. 1974) versuchten diese Vermutung durch den nachfolgend beschriebenen Versuch mittels einer menschlichen Niere in situ durch Perfusion mit synthetischem 7β - ^3H -DHEA-Sulfatid zu untermauern. Die Autoren infundierten einer 46-jährigen Patientin vor einer linksseitigen Hemicolectomie aufgrund eines Dickdarmcarcinoms $0,92 \mu\text{g}$ 7α - ^3H -DHEA-Dipalmitoyl-Glycerosulfat (Oertel 1961) mit $141\,000 \text{ Ipm } ^3\text{H}$ in 5 ml Eigenplasma langsam in die Arteria renalis. Mittels einer in der o.g. Arbeit beschriebenen Methodik wurden im Nierenvenenplasma der Patientin innerhalb von 10 Minuten insgesamt 42,0 % der injizierten Aktivität festgestellt. Der weitaus größte Teil hiervon entfiel auf die Fraktion freier Steroide, gefolgt von Steroidsulfatiden, Steroidglucuronisiden und Steroidsulfaten. Dabei erwies sich Androstendiol als der mengenmäßig wichtigste Metabolit. Im gleichzeitig gewonnenen Harn der perfundierten Niere wurden zunächst überwiegend freie Steroide gefunden, später jedoch vor allem Steroidsulfate und Steroidglucuroniside. Androstendiol, Androsteron und Ätiocholanolon stellten im Harn die wesentlichsten Metabolite dar. Als wesentliches Resultat galt somit der Nachweis einer Hydrolyse von DHEA-Sulfatid zu DHEA-Sulfat in der Niere. Inwieweit extrarenales Gewebe an der Entstehung der Produkte beteiligt war, konnte durch diesen Versuch nicht geklärt werden; es wurden durch Proben im allgemeinen Kreislaufsystem hohe Aktivitäten gemessen. Chung-Hsiu Wu und Mitarbeiter (Chung-Hsiu Wu et al. 1967) inkubierten einen Gelbkörper und Placentagewebe mit Eingeweidehomo-

genaten eines Foeten aus der 13. Schwangerschaftswoche mit $7\alpha\text{-}^3\text{H}$ -Dehydroepiandrosteron. Es konnte die Umwandlung in Östron und 17β -Östradiol in allen Inkubaten beobachtet werden. Die Umwandlung von DHEA zu Östriol wurde nur im Inkubat Placenta mit fetalem Eingeweidehomogenat beobachtet. Daraus schlossen die Autoren, daß DHEA in der frühen Schwangerschaft nicht nur im Bereiche der fetoplacentaren Einheit als Vorstufe für die Östrogen-Biosynthese dient, sondern auch im Gelbkörper.

Die Aussage, daß DHEA als Hauptvorstufe für die Biosynthese von Östrogenen im Gelbkörper der frühen Schwangerschaft anzusehen war, ließen schon Untersuchungen von Georg Flickinger (Flickinger et al. 1967) vermuten. Jensen und Mitarbeiter (Jensen et al. 1972) untersuchten im Jahre 1972 die Steuerung der Synthese von DHEA in der menschlichen Nebenniere, indem sie die Biosynthese des unmittelbaren Vorläufers, nämlich das 17-Hydroxypregnenolon ($3\beta\text{-}17\alpha\text{-Dihydroxypregn-5-en-20-on}$) und die Seitenkettenabspaltung untersuchten. Beide Umwandlungen fanden in den Mikrosomen statt; dort besteht ein notwendiger Bedarf am Co-Faktor NADPH. Unter optimalen Bedingungen wird die 17-Hydroxylierung durch das Vorhandensein des Substrates und des Co-Faktors gesteuert. Unter gleichen kinetischen Bedingungen konnte beobachtet werden, daß die Synthese von DHEA von der Verfügbarkeit von Substrat und Co-Faktor abhängt. Jedoch wurde diese Reaktion durch die oxydierte Form (NADP^+) gehemmt; wenn das Verhältnis von $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ gleich war, wurde die halbe maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht. Die Hauptmetaboliten des 17-Hydroxypregnenolons, namentlich DHEA und Hydroxyprogesteron, stellten keine kompetitiven Hemmer für diese Reaktion dar. Die Hemmkonstanten hängen von der Höhe der Gewebekonzentration dieser Steroide im Nebennierengewebe ab, was vermuten ließ, daß in-vivo keine kompetitive Hemmung stattfindet.

C. Eigene Untersuchungen

1. Durchführung des Experimentes

Das Experiment wurde mit einer frisch entnommenen Niere eines 42-jährigen Mannes durchgeführt, der an einem Nierenbecken-Papillon erkrankt war. Sofort im Anschluß an die Extirpation wurde das Organ mit einem Gesamtgewicht von 158,6 g an einen Perfusor der Marke GAMBOR bei einem maximalen Perfusionsdruck von 195 mm Hg angeschlossen. Das Volumen des Perfusates betrug 900 ml, der ph-Wert lag konstant bei 7,45; die Dauer des Versuches betrug 190 Minuten. Die Temperatur betrug in den ersten 100 Minuten 22°C, in den restlichen 90 Minuten 37°C. Das Perfusat selbst bestand aus Macrodex, als Substrat enthielt es 100 µg 7 α -3H-Dehydroepiandrosteron. Der Reinheitsgrad des markierten Hormons betrug nahezu 100 %, die spezifische Aktivität lag bei 10 - 150/m Mol. Die folgende Tabelle gibt Aufschluß über die in gewissen Zeitabständen entnommenen Aliquote, deren Gesamtmenge sowie der aufgearbeiteten Mengen.

	Zeit	Gesamt-Menge	aufgearbeitet
Perfusat 1	0- 30 min	58 ml	40 ml
Perfusat 2	31- 60 min	50 ml	40 ml
Perfusat 3	61-120 min	50 ml	40 ml
Perfusat 4	121-190 min	55 ml	40 ml
Perfusat 5	am Ende des Versuches	600 ml	40 ml
Urin 1	0-100 min	36 ml	36 ml
Urin 2	100-190 min	36 ml	36 ml
Rinde		62,5 g	10 g
Mark		86,6 g	10 g

Die fehlenden 10,5 g bis zum Gesamtgewicht der Niere mußten bei der Auftrennung von Mark und Rinde als Verlust in Kauf genommen werden.

2. Chemische Aufarbeitung des Materials

a. Perfusat und Urin

Die freien Steroide wurden mit 3 x 50 ml Isopropyläther extrahiert. Anschließend wurde nach gutem Schütteln zentrifugiert und der Äther in einen Rundkolben gegeben und mit der Pipette abgesaugt. In die getrockneten Röhrchen wurde 1 ml Methanol gegeben und gut geschüttelt. Anschließend wurden 0,05 ml entnommen und in ein spezielles Packardröhrchen gegeben. Nach Zugabe der Szintillationsflüssigkeit, gutem Schütteln, wurde dann 10 Minuten im Packard gemessen. Der Rest wurde eingedampft und zur weiteren Charakterisierung und Isolierung einer Dünnschichtchromatographie unterworfen, wie dies im Kapitel 2 c beschrieben ist. Zur Gewinnung der Steroidkonjugate wurde das präextrahierte Perfusat und der Urin mit $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ gesättigt und anschließend mit 2 n HCl auf pH 3 gebracht. Es folgte eine weitere Extraktion mit 4 x 50 ml Methylacetat; über Na_2SO_4 und NaHCO_3 erfolgte die Trocknung und danach wurde eingedampft. Mittels einer Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel im System B und C wurden die Konjugate in Glucuronide und Sulfate aufgetrennt.

Die Sulfate unterwarf man einer Solvolyse in Äther-Perchlorsäure bei 37°C im Wasserbad über 24 Stunden, wie 1967 von Treiber und Oertel beschrieben. Die weitere Charakterisierung erfolgte wie in der unten beschriebenen Methode.

b. Nierengewebe

Nach Auftrennung der Niere (Gesamtgewicht 158,6 g) in Mark und Rinde (86,6 g und 62,5 g) wurden jeweils 10 g der beiden Gewebearten in NaCl 0,9 % homogenisiert und mit 4 x 2,0 Vol. IPA extrahiert. Nach Eindampfung im Rotationsverfahren wurde der Rückstand mit Aceton-Chloroform 1:1 (V/V) 3 x 30 ml aufgenommen. Nach erneutem Ein-

dampfen bis zur Trockne wurde die Gesamtradioaktivität eines geeigneten Aliquots im Liquidszintillationszähler bestimmt, wie es vorher auch schon mit den freien Steroiden und Steroidkonjugaten geschehen war. Auf diese Art ließen sich Verluste bei der Aufarbeitung kontrollieren. Zur Entfettung wurde der Trockenrückstand mit 10 ml n-Hexan versetzt und mit 3 x 30 ml 85 %ig Methanol extrahiert. Nach Eindampfen des Methanols bis zur wässrigen Phase wurde das H₂O mit 3 x 30 ml Äthylacetat extrahiert und anschließend ebenfalls zur Trockne eingedampft. Die weitere Aufarbeitung und Charakterisierung erfolgte wie oben beschrieben.

c. Charakterisierung freier Steroide

Die Isolierung und Charakterisierung einzelner bzw. aus den Konjugatfraktionen freigesetzter Steroide geschah durch wiederholte Dünnschichtchromatographie. Die dazu verwandten Systeme sind in der Tabelle 1 aufgeführt. Nach Versetzen der freien Steroide mit Chloroform-Methanol (1:1) wurde 0,2 ml auf Kieselgelplatten (DC-Fertigplatten "F 254") aufgetragen. Auf beiden Seiten der Platten liefen jeweilige Tests mit. Anschließend ließ man die Platten in mit CHCl₃:Dioxan (94:6) gesättigten Kammern laufen (System A). Nach Bestimmung der radioaktiven Zonen auf den Platten wurden die entsprechenden Strecken des Kieselgels abgekratzt und mit Chloroform-Methanol 9:1 und Chloroform-Methanol 1:1 eluiert und eingedampft: 1/50 der jeweiligen Fraktionen (ATR, ENDL, ANDL, DHEA und ANOLON) der quantitativen Aktivitätsbestimmung im Liquid-Szintillations-Spectrometer (Firma Packard Modell 3310) zugeführt. Die Konjugate wurden durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel in den Systemen B und C in Glucuronide und Sulfate aufgetrennt. Die Eluierung der Sulfate erfolgte mit Methanol, die Glucuronide mit Chloroform/Methanol 1:1.

Mittels Derivatbildung mit 2,4 Dinitrophenylhydrazin und Rechromatographie gelang eine weitere Charakterisierung; durch Zugabe von 20 µg unmarkierter Substanzen ließen sich die einzelnen Steroide bis zur konstanten spezifischen Aktivität reinigen.

d. Derivatbildung

Die Herstellung der 2,4 Dinitrophenylhydrazone geschah nach der Methode von Treiber und Mitarbeiter 1967 mit 2,4 Dinitrophenylhydrazin in 0,3 %iger Trichloressigsäure im absoluten Benzol. Dazu wurde der Trockenrückstand der Dünnschichteluat nach Zugabe von jeweils 200 µg 2,4 Dinitrophenylhydrazin in 3 ml 0,3 %iger Trichloressigsäure in absolutem Benzol aufgenommen. Die farbigen Derivate ließen sich als solche im System B chromatographieren und densitrometrisch quantitativ erfassen (Densitrometer der Firma Schoeffel, BDR).

e. Abkürzungen und Trivialnamen

ATR = Androstentriol = 5-Androsten-3 α , 16 α , 17 α , -triol
ENDL = Androstendiol = 5-Androsten-3 α , 17 α , -diol
ANDL = Androstandiol = 5 α -Androstan-3 α , 17 α , -diol
DHEA = Dehydroepiandrosteron = 3 β -hydroxy-5-androsten-17-on
ANOLON = Androstanolon = 5 α -Androsten-3 α -ol-17-on

3. Ergebnisse und Diskussion

Aus der Tabelle 3 ist die Verteilung der Radioaktivität (Ipm/min/ml Flüssigkeit bzw. g Gewebe) auf freie und konjugierte Steroide in verschiedenen Proben als auch im Gewebe von Mark und Rinde zu ersehen.

Die folgende Tabelle 4 zeigt die Verteilung der Radioaktivität auf verschiedene Metabolite jeweils eines Aliquots aus der Fraktion freier Steroide.

Tabelle 5 gibt Aufschluß über die Verteilung der Radioaktivität auf verschiedene Metabolite jeweils eines Aliquots aus der Fraktion sulfonkonjugierter Steroide.

Tabelle 6 stellt die Verteilung der Radioaktivität in verschiedenen Metaboliten aus der Fraktion der Glucuronide dar.

Wie aus Tabelle 3 und der graphischen Darstellung ersichtlich, nimmt die Konzentration freier Steroide in den Perfusaten 1-5 ab, jedoch nicht linear wie man vermuten könnte, sondern es fällt der besonders starke Abfall in den ersten Minuten auf-nach 30 Minuten wurden 27 500 Impulse gezählt (Perfusat 1), nach 60 Minuten wurden nur noch 16 250 Impulse gezählt (Perfusat 2), wogegen die Radioaktivitätsmessung der Perfusate 3,4 und 5 nur noch eine vergleichsweise geringe Verminderung der Impulszahl gegenüber der jeweiligen Vorprobe erbrachte. Der leichte Anstieg der Impulszahlen im Perfusat 5 gegenüber der im Perfusat 4 war wohl als tolerabler Messfehler in der Versuchsanordnung zu registrieren. Im Gegensatz dazu fiel die Zunahme der Aktivität im Urin 2 verglichen mit Urin 1 auf; wie auch das Nierenmark gegenüber der Rinde eine deutlich höhere Aktivität aufwies. Demgegenüber nahmen die Konzentrationen der Sulfate wie auch der Glucuronide in den

Perfusaten deutlich zu; noch auffälliger stellte sich die Zunahme der Aktivität im Urin dar. Vergleicht man das Nierengewebe selbst, also Rinde und Mark, so stellt man eine überaus starke Konzentration der freien Steroide als auch der Sulfate und Glucuronide, zugunsten des Marks fest.

Betrachtet man die Gesamtaktivität der freien Steroide in den Perfusaten 1-5 und vergleicht sie mit der Verteilung der freien Steroide auf Urin 1 und 2 sowie auf das Nierengewebe, so sieht man, daß die Hauptaktivität im Nierengewebe selbst, und zwar vornehmlich im Mark zu finden ist. Wenn man nun prozentual aufschlüsselt, so zeigt sich folgendes Ergebnis: Annähernd 67,5 % der Gesamtaktivität freier Steroide fand sich im Nierengewebe wieder verteilt zu 26,1 % auf die Rinde und zu 41,4 % auf das Mark. In den Perfusaten 1-5 tauchten dagegen nur 27 % auf, etwa soviel wie in der Nierenrinde. Und von diesen 27 % verteilte sich die Aktivität zu knapp 1/3 auf Perfusat 1, die restlichen 2/3 auf Perfusat 2-5 zu etwa gleichen Teilen (siehe Tabelle 3).

Die Zunahme der Sulfataktivität in den Perfusaten als auch im Urin läßt auf die Fähigkeit der Niere zur Veresterung und Glucuronidierung schließen; In Perfusat 1 und 2 tauchte gemessen an der Gesamtaktivität der Sulfate 1,9 % auf, in den Perfusaten 4 und 5 dagegen 7,8 % und im Urin 2 3,9 % gegenüber Urin 1 mit 0,9 % (ähnliches Verhalten zeigten auch die Glucuronide, wenn auch nicht so evident).

Diese Vorgänge spiegeln die physiologische Funktion der Niere wider in der Konjugierung freier Steroide sowohl mit Schwefel - als auch Glucuronsäure; ganz überwiegend jedoch mit Schwefelsäure. Aus der benutzten Versuchs-

ordnung konnte aufgrund der Tatsache, daß die Sulfate und Glucuronide im Mark in höherer Konzentration vorhanden war als in der Rinde, nicht geschlossen werden, ob eine vorwiegende Konjugation im Mark gegenüber der Rinde stattfand oder ob der bevorzugte Ort der Konjugierung die Rinde darstellt und die Konjugate erst dann ins Mark transportiert wurden.

Daß die Niere zu einer Veresterung der freien Steroide mit Schwefelsäure fähig ist, wurde durch Moser (Moser et al. 1966) schon nachgewiesen, als er ^{35}S -Sulfat, das unter in-vivo Bedingungen injiziert wurde, in Cholesterol- ^{35}S -Sulfat überführen konnte.

Aufgrund der Tatsache, daß auch eine wenn auch geringe Glucuronidierung stattfand, konnte man davon ausgehen, daß die menschliche Niere auch in der Lage ist, Steroide in entsprechende Glucuronide zu überführen.

Diese Fähigkeit der menschlichen Niere konnte Kirdani und Mitarbeiter (Kirdani et al. 1972) zeigen, als sie Östriol-6, 7- ^3H zu einem hohen Prozentsatz mit Hilfe einer entsprechenden Versuchsanordnung in das korrespondierende 16-Glucuronid überführten. Zum gleichen Ergebnis kamen Hobkirk und Mitarbeiter (Hobkirk et al. 1974) bei ihrer in-vitro Inkubation mit Homogenaten menschlicher Nieren, indem sie die Umwandlung von 17 α -Östradiol-6, 7- ^3H in das entsprechende 17-Glucuronid nachwiesen. Im vorliegenden Falle jedoch muß aus den Konzentrationsunterschieden zwischen Rinde und Mark geschlossen werden, daß der bevorzugte Ort der Glucuronidierung das Mark ist.

Aus der Tabelle 4 ist ersichtlich, daß vier Metabolite aus DHEA isoliert und charakterisiert werden konnten. Im einzelnen handelt es sich um: 5-Androsten-3 α , 16 α , 17 α , -triol (ATR); 5-Androsten-3 α , 17 α , -diol (ENDL), 5 α -Androstan-3 α , 17 α , -diol (ANDL) - und 5 α -Androstan-3 α -ol-17-on.

Mengenmässig übertraf das ATR die drei anderen Metaboliten um das Mehrfache. Allein das ANDL konnte mengenmässig ca. 41 % des Metaboliten ATR erreichen, gefolgt von ANDL und Anolon. Im Perfusat 1 war das DHEA nur zu 7,1 % metabolisiert; die Metabolisierungsrate stieg in Perfusat 2 auf 17,1 %, um in den folgenden Perfusaten 3 und 4 dann fast gleichbleibende Raten von ca. 22 % zu zeigen. Nur im Perfusat 5 konnte noch einmal eine Steigerung dieser Rate beobachtet werden, sie lag hier bei ca. 33 %. Diese Zahlen drücken den prozentualen Anteil der Metabolisierung im Versuchsverlauf aus, mit einer starken Zunahme zu Beginn, einer mittleren Plateauphase und einem nochmaligen terminalen Anstieg.

Im Urin war ein signifikanter Anstieg der Metaboliten in der zweiten Probe gegenüber der ersten zu beobachten. Die Konzentration des DHEAs blieb in beiden Proben gleich. Die Metaboliten in Mark und Rinde verteilten sich unterschiedlich. Während im Mark deutlich mehr ATR gefunden wurde, überwog der Anteil des ENDL in der Rinde gegenüber dem Mark um das 1,3-fache. Annähernd zu gleichen Teilen wurde das ANDL in beiden Geweben gefunden, mengenmässig leicht zu Gunsten des Marks. Etwa die doppelte Aktivität zeigte das Anolon im Mark gegenüber der Rinde. Das DHEA selbst tauchte quantitativ zu 1/3 mehr im Mark auf. Hieraus kann geschlossen werden, daß der bevorzugte Ort der Metabolisierung auch hier das Mark ist, was auch schon im Falle der Glucuronisierung nachgewiesen werden konnte. Nur im Falle des ENDL scheint

der Hauptmetabolisierungsort die Rinde zu sein. Wie Tabelle 5 zeigt, waren die sulfonkonjugierten Steroide im Gesamtperfusat wie auch im Gesamturin nur spärlich vertreten. ATR war am wenigsten vertreten, während das Anolon die relativ stärkste Aktivität zeigte, gefolgt von DHEA und im weiteren Abstand von den restlichen Metaboliten. Etwa gleiches Verhalten konnte im Gesamturin festgestellt werden, wenn auch der Anteil von ENDL und ANDL relativ größer war. Das Verteilungsmuster in Rinde und Mark zeigt auch hier, daß nur das ENDL in der Rinde die größere Aktivität zeigt; währenddessen die übrigen sulfonkonjugierten Steroide allesamt ihre Hauptaktivität im Mark aufwiesen. Diese Tatsache konnte ja auch schon vorher, wie Tabelle 4 zeigt, nachgewiesen werden. Man kann also feststellen, daß auch bei der Sulfonkonjugierung des DHEAs der bevorzugte Ort das Mark ist, mit einer Ausnahme, wie bereits dargelegt.

Aus der Tabelle 6 ist ersichtlich, daß die glucuronidierten Metaboliten eine verschwindend geringe Menge, besonders im Gesamtperfusat und Gesamturin, ausmachen. Hier überwog ebenfalls das Anolon, gefolgt von DHEA, das nur kaum die Hälfte des Erstgenannten ausmachte. ATR, ENDL und ANDL waren im Urin und Perfusat zu gleichen Teilen vertreten. Auffällig ist hier, wenn man die Konzentrationen in Mark und Rinde betrachtet, daß diesmal auch das ENDL die größere Aktivität, wie die übrigen Metaboliten, im Mark zeigt.

Aus den hier beschriebenen Versuchen geht hervor, daß die menschliche Niere die Fähigkeit besitzt, das DHEA zu metabolisieren und zu konjugieren. Natürlich können die in-vitro Bedingungen das in-vivo Verhalten nur bedingt kopieren, obwohl versucht wurde, die Perfusion unter möglichst physiologischen Bedingungen durchzuführen. Aus diesem Grunde sind auch die aus diesen Versuchen gezogenen Rückschlüsse nur

bedingt auf das in-vivo Verhalten der menschlichen Niere zu beziehen.

Der große Vorteil dieser Versuchsreihe ist jedoch darin zu sehen, daß die Funktion der menschlichen Niere im Hinblick auf die Metabolisierung von DHEA isoliert betrachtet werden konnte, was in-vivo nicht möglich gewesen wäre.

D. Zusammenfassung

Über einen Zeitraum von 190 Minuten wurde die Niere eines 42-jährigen Mannes in-vitro perfundiert. Das Perfusionsmedium enthielt als Substrat 100 µg 7 α -3H-Dehydroepiandrosteron. Als Metabolite des DHEA konnten bei diesen Untersuchungen Androstendiol, Androstandiol, Androstentriol und Androstanolon gefunden werden.

Im Gesamtperfusat lag die Metabolisierungsrate bei durchschnittlich 27 %, in der Nierenrinde fanden sich ca. 26 %, im Mark 41 % wieder.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß der bevorzugte Ort der Metabolisierung des Dehydroepiandrosterons das Nierenmark darstellt. Gleichzeitig konnte auch die Fähigkeit der menschlichen Niere zur Konjugation freier Steroide nachgewiesen werden; und zwar vornehmlich die Veresterung mit Schwefelsäure, weniger mit Glucuronsäure. Aus der benutzten Versuchsanordnung konnte jedoch nicht geschlossen werden, ob der bevorzugte Ort der Konjugierung das Mark selbst ist, oder ob eine Konjugierung zuerst in der Rinde stattfand und anschließend erst die Konjugate zu einem überwiegenden Teil in das Nierenmark transportiert worden sind.

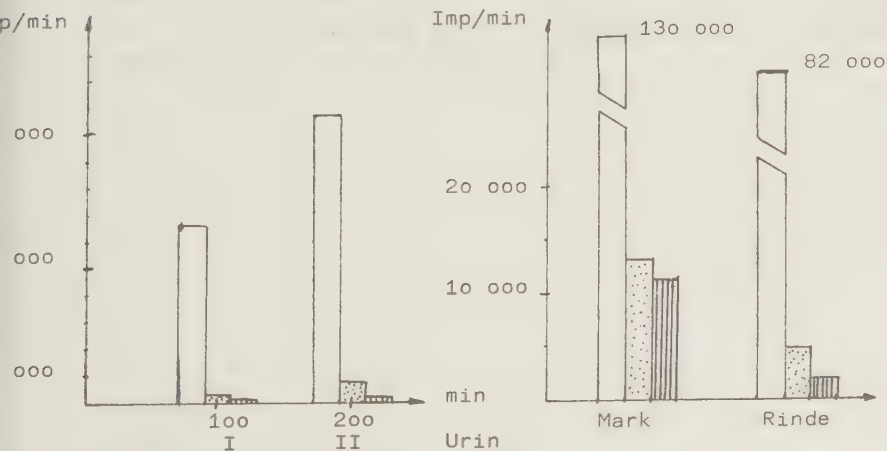
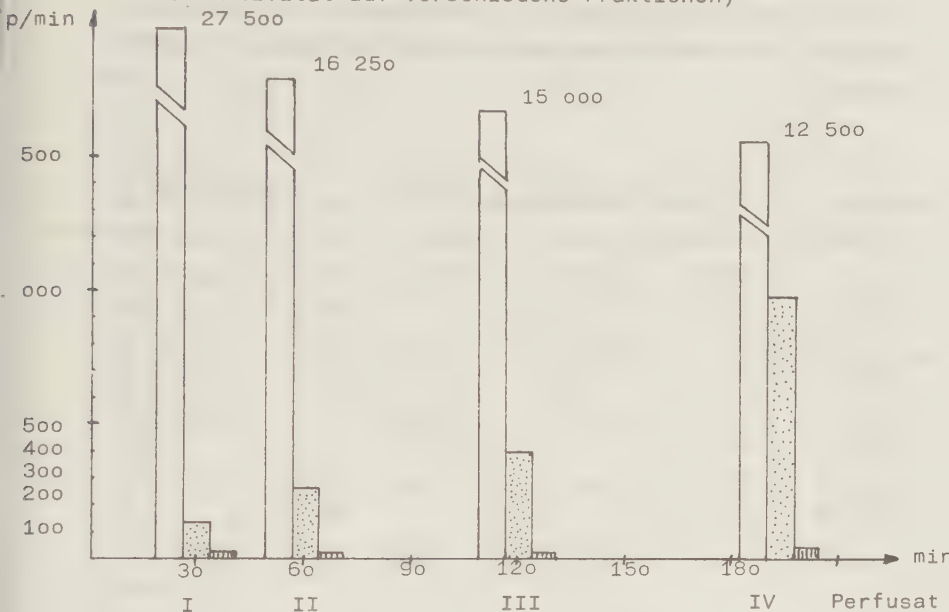
Tabelle 1

Chromatographische Systeme

System		Träger	Laufmittel
A	DSC	Kieselgel	Chloroform/Dioxan
B	DSC	Kieselgel	Chloroform/MeOH/NH ₄ 20:5 :0,5
C	DSC	Kieselgel	Chloroform/MeOH/NH ₄ 10:10:0,5
D	DSC	Kieselgel	Benzol/Athanol 4:2

Tabelle 2

Graphische Darstellungen (Verteilungsmuster der ^3H -Aktivität auf verschiedene Fraktionen)



freie Steroide
 Sulfate
 Glucuronide

Tabelle 3

Verteilung der ^3H -Aktivität auf verschiedene Fraktionen des Perfusats, Urins und Nierengewebes (Impulse/Minute/ml bzw./g Gewebe)

Material	freie Steroide	Sulfate	Glucuronide
Perfusat 1 (0-30')	27 500	137,5	12,5
Perfusat 2 (31-60')	16 250	275	12,5
Perfusat 3 (61-120')	15 000	400	12,5
Perfusat 4 (120-190')	12 750	1 000	25
Perfusat 5 (190')	13 375	675	25
Urin 1 (0-100')	6 527	194	13
Urin 2 (100-190')	10 694	861	22
Rinde	82 000	5 000	2 200
Mark	130 000	13 000	11 000

Tabelle 4

Verteilung der 3H-Aktivität auf verschiedene Metaboliten aus der Fraktion der freien Steroide aus dem Perfusat
Urin und Nierengewebe

Material	ATR	ENDL	ANDL	DHEA	ANOLON
Perfusat 1	625	250	125	18 750	437
Perfusat 2	2 500	425	225	8 750	300
Perfusat 3	3 250	750	275	3 750	250
Perfusat 4	2 500	925	875	3 700	187
Perfusat 5	4 500	1 000	925	3 750	250
Urin 1	1 666	208	222	2 777	138
Urin 2	4 166	416	472	2 777	277
Rinde	1 600	800	3 000	18 000	800
Mark	2 200	600	3 400	25 400	1 500

ATR = 5-Androsten-3 α , 16 α , 17 α , -triol

ENDL = 5-Androsten-3 α , 17 α , -diol

ANDL = 5 α -Androstan-3 α , 17 α , -diol

DHEA = Dehydroepiandrosteron: 3 β -hydroxy-5-Androsten-17-on

ANOLON = 5 α -Androsten-3 α -1 α -17-on

Tabelle 5

Verteilung der 3H-Aktivität auf verschiedene Metabolite der Sulfatfraktion im Gesamtperfusat, Gesamturin und Nierengewebe

MATERIAL	ATR	ENDL	ANDL	DHEA	ANOLON
Perfusat 1-5	15	25	20	60	125
Urin 1 und 2	13,88	69,44	76,38	97,22	166,66
Rinde	200	700	300	3 800	500
Mark	400	500	700	9 000	800

Tabelle 6

Verteilung der 3H-Aktivität auf verschiedene Metabolite der Glucuronidfraktion im Gesamtperfusat, Gesamturin und Nierengewebe

MATERIAL	ATR	ENDL	ANDL	DHEA	ANOLON
Perfusat 1-5	2,5	2,5	2,5	5,0	12,5
Urin 1 und 2	6,94	6,94	6,94	20,83	34,72
Rinde	150	180	200	1 700	200
Mark	700	400	1 000	8 000	1 100

E. Literaturverzeichnis

1. Baulieu, E.F. (1960): J. Clin. Endocr. 20, 900
2. Baulieu, E.F. (1962): J. Clin. Endocr. 22, 501
3. Baulieu, E.F., Corpechot, C., Dray, F., Memiliozzi, R., Lebcau, M.C., Mauvais-Jarvis, P. u. Robel, P. (1965): Rec. Progr. Hormone Res. 26, 411
4. Bolte, E., Mancuso, S., Erikson, C., Wiquist, N. u. Diczfalusy, E. (1964): Acta Endocr. 45, 535, 560, 376
5. Brehm, G., Lachner, H., Oertel, G.W. u. Menzel, P. (1969): Arch. klin. exp. Dermat. 234, 117
6. Breuer, H. (1962): Acta Endocr. 40, 111
7. Breuer, H. (1962): The metabolism of the natural oestrogens. Vitam and Horm. 20, 285
8. Chung-Hsui Wu, Flickinger, G.L. u. Touchstone, J.C. (1967): Conversion of Dehydroepiandrosterone-7 α -3H to Oestrogens by Corpus luteum, Placenta, and Placenta plus foetal viscera in early human pregnancy. Acta Endocr. 54, 181-188
9. Cohen, G.L., Bondy, P.K. u. Castiglione, C. (1961): J. clin. Invest. 40, 400
10. Cohen, G.L., Hume, M. (1960): The in-vivo glucuronide conjugation of radioactive etiocholanolone and androsterone by the dog kidney. J. clin. Invest. 39, 1581-89
11. Dillard, M., Bondy, P.K. (1969): Conjugation of androsterone by guinea-pig in vitro. Biochem. 112, 407-413
12. Diczfalusy, E., Lauritzen, C. (1961): Östrogene beim Menschen. Springer, Berlin
13. Donald Mac, P.C., Chapdelaine, A., Gonzalez, O., Gurpide, E., Van de Wiele, R. u. Liebermann, S. (1965): J. clin. Endocrinol. Metab. 25, 1557
14. Dorfman, R.J., Shiphey, R.A. (1956): Androgens. Wiley, New York
15. Dorfman, R.J. u. Ungar F. (1965): Metabolism of Steroid Hormones. Academic Press, New York

16. Flickinger, G.L., Chung-Hsui Wu and Touchstone, J.C. (1967): The Conversion of Dehydroepiandrosterone - 7 -3H to oestrogens by corpora lutea of early human pregnancy. *Acta Endocr.* 54, 30-36
17. Fries, N., Knapstein, P., Wendlberger, F. und Oertel, G.W. (1967): *Acta Endocrinol.* 56, 705
18. Hellmann, L., Nakada, F., Zumoff, B., Fukushima, D., Bradlow, H. C., Gallagher, T.F. (1971): Renal capture and oxidation of cortisol in man. *J. clin. Endocr.* 32, 52
19. Hobkirk, R., Nilsen, M. (1971): Metabolism of 17 β -estradiol to 17 β -estradiol-3-glucosiduronate and 17 β -estradiol-17-glucosideronate by the normal human female. *J. clin. Endocr.* 32, 779-785
20. Hobkirk, R., Green, R.N., Nilsen, M., Jennings, B.A.: (1974): Formation of estrogen glucosiduronates by human kidney homogenates. *Can. J. Biochem.* 52, 9-14
21. Hobkirk, R., Green, R.N., Nilsen, M., Jennings, B.A., (1974): Direct conversion of 17 β -estradiol-3-glucosiduronate and 17 β -estradiol-3-sulfate to their 17-keto-forms by human kidney homogenates. *Can. J. Biochem.* 52, 15-20
22. Hobkirk, R., Green, R.N., Nilsen, M., Jennings, B.A. (1974): Formation of estrogen glucosiduronates by human kidney homogenates. *Can. J. Biochem.* 52, 9-14
23. Hoffmann, W., Breuer, H. (1968): Vorkommen von UDP-Glucuronyltransferasen in der Magenschleimhaut des Menschen. *Klin. Chem.* 6, 85-88
24. Hoffmann, G., Wendelberger, F., Oertel, G.W. (1974): Metabolismus von Steroidkonjugaten, XIII. In vivo Perfusion der menschlichen Niere mit 7 α -3H-Dehydroepiandrosteron
25. Huhtaniemi, J., Vikho, R. (1972): Steroid metabolism in kidney tissue. In: Endogenous neutral steroids in foetal kidneys and studies on their formation. *Acta Endocr.* 71/3, 530-538

26. Jensen, V., Carson, P., Desphande, N. (1972): Some aspects of the control of Dehydroepiandrosterone synthesis on the human adrenal gland in vitro. *J. Endocr.* 55/2, 311-321
27. Kaiser, E., Schmidt-Elmendorff, H., Döbele, G., van der Crabben, H., Dadze, S., Gerteis, W. (1969): *Acta Endocrinol. Suppl.* 138, 229
28. Kirdani, R.Y., Sampson, D., Murphy, G.P., Sandberg, A.A. (1972): Studies on phenolic steroids in human subjects. XVI. Role of the kidney in the disposition of estriol. *J. Clin. Endocr.* 34, 546
29. Kirschner, M.A., Lipsett, M.B. (1964): The effect of exogenous precursors on etiocholanolone/androsterone ratios in man. *Acta Endocr. (Kbh)* 46, 207
30. Klopper, A.J., Michie, E.A. (1956): The excretion of urinary pregnandiol after the administration of progesterone. *J. Endocr.* 13, 360
31. Knapstein, P., Wendlberger, F. u. Oertel, G.W. (1967): *Europ. J. Biochem.* 2, 384
32. Knapstein, P., Wendlberger, F. u. Oertel, G.W. (1967): *Experientia* 23, 480
33. Knapstein, P., Rindt, W., Wendlberger, F. u. Oertel, G.W. (1967): *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 318, 93
34. Ladany, S., Finkelstein, M. (1963): Isolation of Estrone, estradiol-17 β and estriol from female human urine. *Steroids* 2, 297
35. Marrian, G.F. (1929): The Chemistry of Oestrin. 1. Preparation from Urine and separation from an unidentified solid alcohol. *Biochem. J.* 23, 1090
36. Mason, M. u. Gullekson, E. (1959): *J. Am. Chem. Soc.* 81, 1317
37. Mason, M. u. Gullekson, E. (1960): *J. biol. Chem.* 235, 1312

38. Morato, T., Lemus, A.E. u. Gual, C. (1965): Steroids Suppl. 1, 59
39. Moser, H.W., Moser, A.B., Orr, J. C. (1966): Preliminary observations on the occurrence of the cholesterol sulfate in man. Biochem. Biophys. Acta 116, 146
40. Oertel, G.W. (1964): Hoppe-Seyler's Z. physiolog. Chem. 336, 236
41. Oertel, G.W. (1966): Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 345, 276
42. Oertel, G.W. (1961): Biochem. Z. 334, 431
43. Oertel, G.W. u. Kaiser, E. (1962): Biochem. Z. 336, 10
44. Oertel, G.W. , Groot, K. u. Brühl, P. (1965): Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 341, 10
45. Oertel, G.W. , Knapstein, P. , Treiber, L. (1966): Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 345, 221
46. Oertel, G.W. (1963): Biochem. Z. 339, 125
47. Oertel, G.W. u. Treiber, L. (1968): Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349, 11
48. Oertel, G.W. u. Treiber, L. (1966): Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 344, 163
49. Oertel, G.W., Treiber, L. u. Rindt , W.(1967): Experientia 23, 97
50. Oertel, G.W., Groot, K. u. Wenzel, D. (1965): Acta Endocrinol. 49, 533
51. Oertel, G. W. u. Rebelein, I. (1969): Biochem. biophys. Acta 44, 189
52. Oertel, G.W. , Menzel, P. und Bauke, D. (1970): Clin. chem. Acta 27, 197
53. Oertel, G.W., Menzel, E. u. Weizel, P. (1970): Z.physiol. Chem. 331, 759
54. Oertel, G.W., Menzel, P. u. Bauke D. (1970): Steroidologia 1, 2

55. Oertel, G.W. u. Menzel P. (1970): *Arzneim.-Forsch.*
(Drug. Res.) 20, 417
56. Oertel, G.W. u. Menzel , P. (1970): *Arzneim.-Forsch.*
(Drug. Res.) 20, 1865
57. Oertel, G.W. u. Menzel, P. in Vorbereitung
58. Oertel, G.W. (1971): *Arzneim.-Forsch.* (Drug.-Res.) 21, 4
59. Plotz, J. (1961): Studies with labelled progesterone
in human pregnancy . In: Brook Lodge Symposium Pro-
gesterone, hsg. von Barnes, A.C. Brook Lodge Press,
Augusta, Mich.
60. Rice, L.J., Rice, E.H., Spolter, L., Marx, W. , O' Brien,
S. (1968): Sulfation of cholesterol in rat kidney and
liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 127, 37-42
61. Rindt, W. , Heinene, G. u. Oertel, G.W. (1969): *Acta*
Endocrinol. Suppl. 138, 230
62. Schubert, K. u. Wehrberger, K. (1960): Isolierung von
Testosteron aus Normalharn. *Naturwissenschaften* 47, 281
63. Schubert, K., Hobe, G. u. Wehrberger, K. (1967): *Natur-*
wiss. 54, 141
64. Siiteri, P.K. u. Donald Mac, P.C. (1966): *J. Clin.*
Endocrinol. 26, 751
65. Smith, O.W. u. Ryan, K. (1961): *J. Endocrinology* 69, 869
66. Sonka, J. , Gregorova, I. , Slabochova, Z. u. Rath, H.
(1963): *Endocrinologie* 43, 115
67. Sonka, J. , Gregorova, I., Jiranek, M., Kölbel, F. u.
Matys, Z. (1965): *Endokrinologie* 47, 152
68. Treiber, L. u. Oertel, G.W. (1968): *Z. klin. Chemie klin.*
Biochem. 6, 367
69. Vadasz, E. u. Debreczeni, M. (1967): *Hautarzt* 18, 10
70. Venning, E.M. , Browne, J.S.U. (1936): Isolation of a
watersoluble pregnanediol complex from human pregnancy
urine. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 34, 792

71. Venning, E.M. ,Henry, J.S. u. Browne, J.S.U. (1937):
The measurement of a pregnandiol complex in human
urine. Canad. med. Ass. J. 36, 83
72. Wotiz, H., Davis, J.W. , Lemon, H.H. u. Gut, M. (1936):
J. biol. Chem. 222, 487
73. Zander, J., Henning, H.D. (1961): Hormone und Inter-
sexualität. In : Die Intersexualität , hsg. von
Overzier, C., Thieme , Stuttgart
74. Zander, J. (1961): The Chemical Estimation of Progesterone
and Its Metabolits in Body Fluids and Target Organs. In:
Brook Lodge Symposion Progesterone, hsg. Barnes, A.,
C. Brook Lodge Press, Augusta, Mich.
75. Zander, J. (1963): Die Hormonbildung der Plazenta und
ihre Bedeutung für die Frucht. Arch. Gynäk. 198, 113

Herrn Prof. Dr. med. P. Knapstein gilt mein Dank für die Überlassung des Themas und für die laufende Unterstützung und wertvollen Anregungen bei der Durchführung der Arbeit.

Ebenso danke ich Fräulein Christine Krämer für die außerordentliche Hilfsbereitschaft bei der praktischen Durchführung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 28. Februar 1947 wurde ich als Sohn des Diplom-Chemikers Dr. Johannes Wöllner und seiner Ehefrau Ilse, geb. Bleßmann in Moers/Niederrhein geboren.

Von Ostern 1953-Ostern 1957 Besuch der Diesterwegschule in Moers. Anschließend Schüler des Staatlichen Gymnasiums Adolfinum in Moers. Am 17. Februar 1966 bestand ich das Abitur.

Anschließend studierte ich ein Semester an der Universität Köln Naturwissenschaften; ab Oktober 1966-April 1968 Ableistung des Grundwehrdienstes bei der Bundeswehr.

Nach einem Wartesemester an der Universität Mainz Übernahme in die Medizinische Fakultät zum Wintersemester 1968/69.

Am 8.10.1969 bestand ich das Vorphysikum, das Physikum legte ich am 25.9.1971 ab.

Am 21. März 1974 heiratete ich Fräulein Renate Blumenstiel. Mein medizinisches Staatsexamen bestand ich am 3.12.1974.

Anschließend vom 1. Januar 1975-30. April 1975 Medizinalassistent an der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universität Mainz. Vom 1. Mai-31.12.1975 als Medizinalassistent in der Chirurgischen Abteilung des Krankenhauses Bethanien in Moers.

Die Approbation wurde am 19. Januar 1976 erteilt.

Am 13. März 1976 Geburt meines Sohnes Jens.

Seit dem 1. März 1976 bin ich als Assistenzarzt in der Inneren Abteilung des Krankenhauses Bethanien tätig.

